

УДК 579.24+57.013+577.35

АНАЛИЗ ЭЛЕКТРОФИЗИЧЕСКИХ ПРОФИЛЕЙ ПЛАНКТОННЫХ И БИОПЛЕНОЧНЫХ КЛЕТОК НА МОДЕЛИ БАКТЕРИЙ *AZOSPIRILLUM BALDANIORUM*

© 2024 г. А. В. Шелудько^{а, *}, С. С. Евстигнеева^а, Е. М. Телешева^а,
Ю. А. Филиппчева^а, Л. П. Петрова^а, Д. И. Мокеев^а, И. В. Волохина^а,
И. В. Борисов^а, В. Д. Бунин^б, О. И. Гулий^{а, **}

^аИнститут биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ “Саратовский научный центр РАН”,
Саратов, 410049, Россия

^бEloSystem GbR, Berlin 13407, Германия

^{*}, ^{**}e-mail: shel71@yandex.ru; gulyi_olga@mail.ru

Поступила в редакцию 08.04.2024

После исправления 10.06.2024 г.

Принята к опубликованию 17.06.2024 г.

Формирование биопленок является широко распространенным явлением в мире микробов. Они способны оказывать влияние на здоровье людей и животных, наносить ущерб различным отраслям промышленности, и в тоже время могут быть полезны в таких областях, как очистка сточных вод или увеличение биодоступности питательных веществ для растений. Это актуализирует развитие методов исследования биопленок. В данной работе впервые описан оптический сенсорный метод индикации формирования бактериальной биопленки с учетом биологической изменчивости на примере стимулирующих рост растений ризобактерий рода *Azospirillum*. Обнаружена корреляция между изменениями регистрируемых сенсорной системой электрофизических параметров и морфологическими особенностями бактерий из планктонных и/или биопленочных культур: наличие двигательных органелл (жгутиков), полиморфизма и ультраструктуры клеточных форм. Установлено, что регистрируемый оптической системой профиль микробных клеток значительно отличается в планктонной и биопленочной формах. При сравнении клеток различных штаммов (родительский штамм и его производные) или планктонных и биопленочных бактерий переменные, фиксируемые электрооптической сенсорной системой, согласуются с зафиксированными нами другими методами изменениями микро- и ультраструктуры бактерий. Результаты анализа электрофизических профилей *A. baldaniorum* Sp245 могут быть использованы в качестве референсных для выявления специфичности взаимодействия биопленочных клеток этого штамма с различными компонентами поверхности корня предполагаемого растительного партнера с использованием оптической сенсорной системы.

Ключевые слова: *Azospirillum baldaniorum*, биосенсоры, жгутики, подвижность, биопленки, ультраструктура

DOI: 10.31857/S0026365624060066

Бактериальные биопленки присутствуют повсюду как преобладающая форма жизни микробов практически во всех биотических и абиотических системах (Cámara et al., 2022). Формирование бактериальных биопленок является одним из важных факторов развития стойких внутрибольничных инфекций, а также заражения медицинских устройств. Биопленки оказывают серьезное влияние на здоровье людей и животных, создают проблемы с безопасностью пищевых продуктов, нарушают добычу нефти и газа и загрязняют запасы

питьевой воды. В других областях они могут быть полезны, например, таких как процессы очистки сточных вод и почвы или увеличение биодоступности питательных веществ для растений (Bogino et al., 2013; Hemdan et al., 2021; Cámara et al., 2022). Так успешное формирование и функционирование растительно-микробной ассоциации и противостояние бактерий и растений различным абиотическим стрессам возможно благодаря способности микроорганизмов, стимулирующих рост растений, формировать биопленки на корнях

растения-хозяина (Bogino et al., 2013). Биопленки представляют собой организованные гетерогенные сообщества микробных клеток, заключенных в самопродуцируемый сложный матрикс, состоящий из внеклеточного полимерного вещества, разделенного открытыми каналами, обеспечивающими лучшую диффузию питательных веществ и более легкое удаление продуктов метаболизма (Bogino et al., 2013; Hemdan et al., 2021; Cámara et al., 2022).

Формирование бактериальных биопленок является ключевым фактором, который необходимо учитывать при работе с культурами микроорганизмов. Обнаружение, диагностика и контроль формирования биопленок являются важными моментами, необходимыми не только для предотвращения развития биопленки, но и для развития методов управления процессами пленкообразования, как в медицинских, так и биотехнологических аспектах. Это справедливо не только для лабораторных исследований, но и для тестирования в реальных условиях, например, для контроля эффективности борьбы с биопленками в инженерных системах водоснабжения или для измерения результатов официальных клинических испытаний новых противомикробных препаратов. Подходы, используемые для анализа биопленок, основаны на методах окрашивания пленок, микроскопического анализа, использовании спектрохимических, электрохимических, пьезоэлектрических, оптических и сенсорных методов (O'Toole, Kolter, 1998; Salcedo et al., 2015; Hartmann et al., 2021; Guliy et al., 2022). Однако существует важный исследовательский пробел, как в фундаментальном, так и в прикладном контексте, в возможностях точно моделировать, прогнозировать и оценивать активность биопленок в реальных условиях (Cámara et al., 2022). Более того, изменчивость, присущая микробным клеткам, диктует необходимость в проведении нескольких параллельных независимых исследований для обеспечения надежности методов индикации бактериальных биопленок (Salcedo et al., 2015). Так, например, известно, что свободно плавающие ("планктонные") бактерии, переходя к существованию в составе биопленки, утрачивают зависящую от жгутиков подвижность. В то же время инактивация генов, отвечающих за подвижность, негативно влияет на формирование микробами биопленок (Guttenplan, Kearns 2013; Shelud'ko et al., 2019). Поэтому актуальным является не только развитие метода исследования биопленок и клеток в их составе, но и адаптация методов анализа биопленки для подвижных бактерий. Известно, что при переходе бактерий из планктонной формы в биопленочную происходит изменение их физиологического состояния (Otto, 2008; Junne et al., 2010), которое сопровождается перераспределением ионов и зарядов на поверхности микробной клетки, что и может быть зафиксировано оптическим датчиком.

Объектами настоящего исследования стали стимулирующий рост растений типовой штамм *A. baldaniorum* Sp245 (ранее *A. brasiliense* Sp245; Dos Santos Ferreira et al., 2020), формирующий биопленки на различных поверхностях (Baldani et al., 1983; Шелудько и соавт., 2010; Шелудько и соавт., 2020), и полученный нами ранее мутант, у которого вставка транспозона *Omegon-Km* произошла в ген одного из ключевых элементов экспортного аппарата полярного жгутика — белка FlhB1 (*flhB1*) (Filip'echeva et al., 2018). В жидких средах бактерии штамма Sp245 плавают с помощью полярного жгутика (Fla). При росте на полужидких и плотных средах на клетках Sp245, как и в случае других азоспирилл, дополнительно появляются многочисленные латеральные жгутики (Laf), используемые бактериями для рояния (Moens et al., 1996; Filip'echeva et al., 2018).

Цель работы заключалась в развитии оптического сенсорного метода исследования планктонных и биопленочных бактерий *A. baldaniorum* Sp245 с учетом клеточных структур, обеспечивающих их подвижность.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы бактерий и питательные среды. В работе использовали штамм *A. baldaniorum* Sp245 [IBPPM 219] (ранее *A. brasiliense* Sp245; Dos Santos Ferreira et al., 2020), выделенный в Бразилии из корней пшеницы (*Triticum* sp.) (Baldani et al., 1983), и его (Km^R) мутант Fla⁻Laf⁻ Sp245.1063 (*flhB1::Omegon-Km*) (Filip'echeva et al., 2018).

Бактерии культивировали при 30°C на малатно-солевой среде (MCC) (Döbereiner, Day, 1976) и на среде Luria–Bertani (LB) (Sambrook et al., 1989). При необходимости в среды добавляли 50 мкг/мл канамицина (Km).

Анализ формирования и микроструктуры биопленок. Ночные (20 ч) культуры азоспирилл, выращенные с аэрацией в жидкой среде LB, отмывали 50 мМ фосфатным буфером (ФБ) (рН 7.0) и суспендировали до ОП₅₉₀ = 0.05–0.10 (*I* = 0.5 см) в свежей LB. Вносили по 2 мл полученных суспензий в стеклянные пробирки, инкубировали при 30°C в стационарных условиях. Относительное количество биомассы в зрелых биопленках оценивали посредством окраски биопленок кристаллическим фиолетовым (O'Toole, Kolter, 1998). Клетки из смывов с поверхности стекла биопленок или планктонных культур также исследовали на предмет наличия жгутиков и их длины с использованием просвечивающего электронного микроскопа Libra 120 ("Carl Zeiss", Германия) при ускоряющем напряжении 120 кВ. Фазово-контрастную и просвечивающую электронную микроскопию биопленок и отдельных клеток, изучение подвижности

бактерий, определение толщины биопленок выполняли на приборах, находящихся в ЦКП “Симбиоз” ИБФРМ РАН (г. Саратов, Россия): Leica DM6000 B (“Leica-Microsystems”, Германия) и Libra 120 (“Carl Zeiss”, Германия). Топографию поверхности биопленок исследовали с помощью атомно-силового микроскопа SolverBio (“НТ-МДТ”, Россия). Подробную информацию о процедурах подготовки препаратов для микроскопии и их анализа можно найти в работах (Schelud’ko et al., 2009; Шумилова и соавт., 2016; Shelud’ko et al., 2019).

Приготовление ультратонких срезов. Биопленки осторожно промывали и смывали 50 мМ ФБ (pH 7.0). Смывы, содержащие фрагменты биопленок, или 24-часовые планктонные культуры из жидкой МСС с азотом, выросшие в условиях аэрации, осаждали центрифугированием. Полученные образцы биопленочных и планктонных клеток поэтапно фиксировали и обезвоживали, как описано ранее (Шелудько и соавт., 2020). Обезвоженный материал заключали в эпоксидную смолу Epon 812. Срезы получали на ультратоме, переносили на сеточки и при необходимости негативно окрашивали 3% раствором уранилацетата в 70% спирте. Ультратонкие срезы просматривали в просвечивающем электронном микроскопе Libra 120 (“Carl Zeiss”, Германия) при ускоряющем напряжении 120 кВ.

Определение численности жизнеспособных клеток в биопленках и их устойчивости к высушиванию. Зрелые биопленки осторожно промывали 50 мМ ФБ (pH 7.0). Определяли количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в промытых нативных не подвергавшихся каким-либо воздействиям и сухих биопленках. В последнем случае промытые биопленки сушили при 30°C и хранили при 37°C. Для определения КОЕ в пробирки с биопленками вносили по 2 мл 50 мМ ФБ (pH 7.0), инкубировали 1 ч и смывали биомассу. Биомассу ресуспендировали в 50 мМ ФБ (pH 7.0) и 1 мин диспергировали на встряхивателе Vortex. Из полученной суспензии готовили серию десятикратных разведений и высевали из них по 100 мкл на плотную среду. Результаты с учетом разведения пересчитывали на 1 мл смыва. В качестве контроля использовали пробирки, в которых 6 сут инкубировали стерильную питательную среду. Результаты повторного проверочного окрашивания поверхности стекла опытных пробирок после смывания из них биопленок не отличались от контрольных значений и не превышали 0.04 ед. ОП₅₉₀ ($l = 0.5$ см), что свидетельствовало о полноте смывания биомассы биопленок.

Обработка биопленок проназой и периодатом натрия. В работе использовали 40 мМ раствор NaIO₄ в дистиллированной воде. Проназу растворяли в 100 мМ Tris-HCl буфере (pH 7.5) до концентрации 1000 мкг/мл и инкубировали 2 ч при 37°C, затем разводили в 50 мМ ФБ (pH 7.0) в соотношении 1 : 9.

Растворы фермента или NaIO₄ добавляли к биопленкам, предварительно удалив планктонную культуру (по 2 мл в пробирку); с ферментами инкубировали 2 ч при 37°C. В контрольных вариантах использовали 50 мМ ФБ (pH 7.0). С NaIO₄ инкубировали 23 ч при 4°C. В качестве контроля использовали дистиллированную воду, содержащую по 40 мМ NaIO₄ и глюкозы. После инкубации биопленки однократно отмывали дистиллированной водой и окрашивали 1% раствором кристаллического фиолетового при комнатной температуре, затем дважды промывали дистиллированной водой. Краситель, связавшийся с биомассой биопленок, растворяли в этаноле и измеряли при $\lambda = 590$ нм ($l = 0.5$ см) оптическую плотность раствора. Результаты выражали в процентах относительно соответствующих контрольных проб.

Подготовка образцов для сенсорного контроля. Биопленки выращивали в стеклянных пробирках в течение 6 сут при 30°C в стационарных условиях. удаляли планктонную культуру и смывали аспирацией биомассу пленок с поверхности стекла. У азоспирилл к 6 сут инкубации стабилизируется относительное количество биомассы биопленок и завершается процесс их формирования на поверхности стекла (зрелые биопленки) (Шелудько и соавт., 2015). Затем клетки осаждали (13000 g, 5 мин), после чего ресуспендировали в стерильной дистиллированной воде. Мониторинг осуществлялся с помощью прибора EloSystem 1.0 (“EloSystems GbR”, Германия). Перед анализом клетки трижды промывали от питательной среды центрифугированием (2800 g, 5 мин) в дистиллированной воде (электропроводность 1.6–1.8 мкСм/см), а затем центрифугировали однократно (1000 g, 1 мин) для удаления клеточных агрегатов. Измеряемые переменные были следующими: напряженность электрического поля – 93.1 В/см; длина волны света 670 нм (относительно вакуума); время приложения электрического поля 3.0 с. Объем измерительной ячейки составил ~1 мл, а концентрация клеток в измерительной ячейке ОП₆₇₀ (в единицах поглощения) колебались от 0.4 до 0.5. В экспериментах использовали дискретный набор частот ориентирующего поля: 740, 1000, 1450, 2000 и 2800 кГц.

В основе оптического метода анализа лежит поляризация частиц, суспендированных в непроводящей жидкости, под воздействием переменного электромагнитного поля. Регистрируемым параметром является изменение оптических параметров бактериальной суспензии под воздействием переменного электрического магнитного поля в указанном диапазоне частот. Клетки под действием поля вследствие поляризации меняют свою ориентацию, что приводит к изменению производимого ими светорассеяния. Это изменение детектируется анализатором. В качестве интегрального параметра распределения электрических зарядов

по границам клеток и клеточных структур, описывающего поляризуемость клетки как функцию частоты электрического поля, использовался тензор поляризуемости $\alpha(\omega)$. Вращательный момент клетки при изменении ее пространственной ориентации пропорционален разнице между продольной $\alpha_{||}(\omega)$ и осевой $\alpha_{\perp}(\omega)$ компонентами тензора $\alpha(\omega)$: $\Delta\alpha(\omega) = \alpha_{||}(\omega) - \alpha_{\perp}(\omega)$ (Guliy et al., 2022).

Для каждого эксперимента использовали не менее 5 циклов измерения. Все эксперименты проводились не менее чем в трех повторностях с соблюдением аналогичных условий выращивания культур и подготовки образцов. Относительная погрешность результатов измерений составляла $\pm 5\%$, т.е. при проведении нескольких экспериментов с одними и теми же бактериями регистрируемые значения имели разброс значений на любой измеряемой частоте в пределах $\pm 5\%$. Кривые на рисунках строили по средним значениям, полученным в результате не менее пяти измерений.

Статистическая обработка результатов. Выполняли не менее трех независимых экспериментов как минимум в двух повторностях. Статистическую обработку данных проводили с использованием t -критерия Стьюдента (доверительные интервалы даны для 95% уровня значимости) и однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) (при уровне значимости $p \leq 0.05$). Для статистической обработки использовали пакет программ Microsoft Office Excel 2010. Анализ распределения клеток по длине проводили с использованием инструмента анализа Гистограмма из пакета программ Microsoft Office Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ планктонной формы бактерий. Штамм *A. baldaniorum* Sp245 и его мутант Sp245-*flhB1::Omegon-Km* (Sp245.1063) примерно с одинаковой скоростью росли в жидкой среде. В 18–24-часовых планктонных культурах $(88.4 \pm 3.9)\%$ клеток Sp245 синтезировали длинный Fla (рис. 1А (1)), обеспечивающий их подвижность (рис. 2А), а в случае Sp245.1063 $(87.7 \pm 7.0)\%$ бактерий были лишены флагеллы (рис. 1А) (Filip'echeva et al., 2018). У мутанта бактерии, сохраняющие синтез длинного или короткого Fla, оказались неподвижны.

Электрофизические профили планктонных клеток родительского штамма Sp245 и Sp245.1063 характеризовались существенными различиями величины зарегистрированных изменений сенсорных переменных (рис. 2Б (1)). Зафиксированные различия регистрируемых данных для планктонных клеток мутанта и Sp245 могут быть обусловлены в значительной степени изменениями жгутикования бактерий Sp245.1063. В данном случае утрата бактериями Fla согласуется с существенным

увеличением величины зарегистрированных изменений у мутанта (рис. 2Б (1)). Для удобства на рис. 2Д приведены результаты изменения сигнала датчика на частоте 740 кГц.

Профили графиков (рис. 2Б (1)) для планктонной формы бактерий родительского штамма Sp245 и его мутанта Sp245.1063 были использованы как эталонные в дальнейшем при анализе биопленочной культуры.

Анализ клеток азоспирилл, сформировавших биопленки. В процессе формирования биопленок адсорбция и адгезия клеток штаммов Sp245 и Sp245.1063 к твердой поверхности, находящейся под жидкой средой, происходила на 2–3 сут культивирования, а к 5–6 сут наблюдался максимальный прирост и стабилизация биомассы биопленки (рис. 2Г). На стадии адгезии бактерии образовывали тонкие пленки, при микроскопии которых видны разрозненные клеточные агрегаты. С 3 сут инкубации микроколонии сливались в биопленку с более ровной поверхностью. Различия в относительном количестве биомассы в биопленках штамма Sp245 и его мутантов проявлялись к 6 сут инкубации (зрелые пленки) (рис. 2Г). Через 6 сут культивирования под жидкой средой LB мутант накапливал значительно меньше биомассы в биопленках, чем Sp245. Пленки Sp245.1063 были тоньше, чем Sp245 (таблица, в)). Количество КОЕ в биопленках Sp245 и Sp245.1063 существенно не отличалось (таблица, б)). Стоит отметить, что начиная со вторых суток инкубации, азоспириллы колонизируют не только твердую поверхность, но и образуют биопленку на разделе воздух/жидкость, которая с течением времени может оседать под толщу жидкости (на дно пробирки). Биомасса биопленок Sp245 или Sp245.1063, сформированных на стекле, после инкубации с проназой, убывала на 25–35% (рис. 2Е). После обработки периодатом натрия, модифицирующим гликополимеры, окисляя полисахариды с образованием диальдегидполисахаридов, биомасса зрелых биопленок Sp245 убывает на 40%, а в случае мутанта эта величина составляет 63% (рис. 2Е).

Электрофизические профили биопленочных клеток Sp245 или Sp245.1063 заметно отличались от профилей, характерных для планктонных бактерий (рис. 2Б (3 и 4)). У азоспирилл из биопленок величина зарегистрированных изменений сенсорных переменных была ниже таковой из планктонных культур (рис. 2Б (3 и 4)). При сравнении электрофизических профилей бактерий родительского штамма Sp245 и мутанта, сформировавших биопленки, также наблюдали различия (рис. 2Б (2)). Результаты изменений на частоте 740 кГц, приведенные на рис. 2Д, свидетельствуют, что величина зарегистрированного сигнала датчика у биопленочных клеток Fla⁺Laf⁺ мутант Sp245.1063 выше значений, характерных для бактерий Sp245, как и в случае сравнения планктонных культур

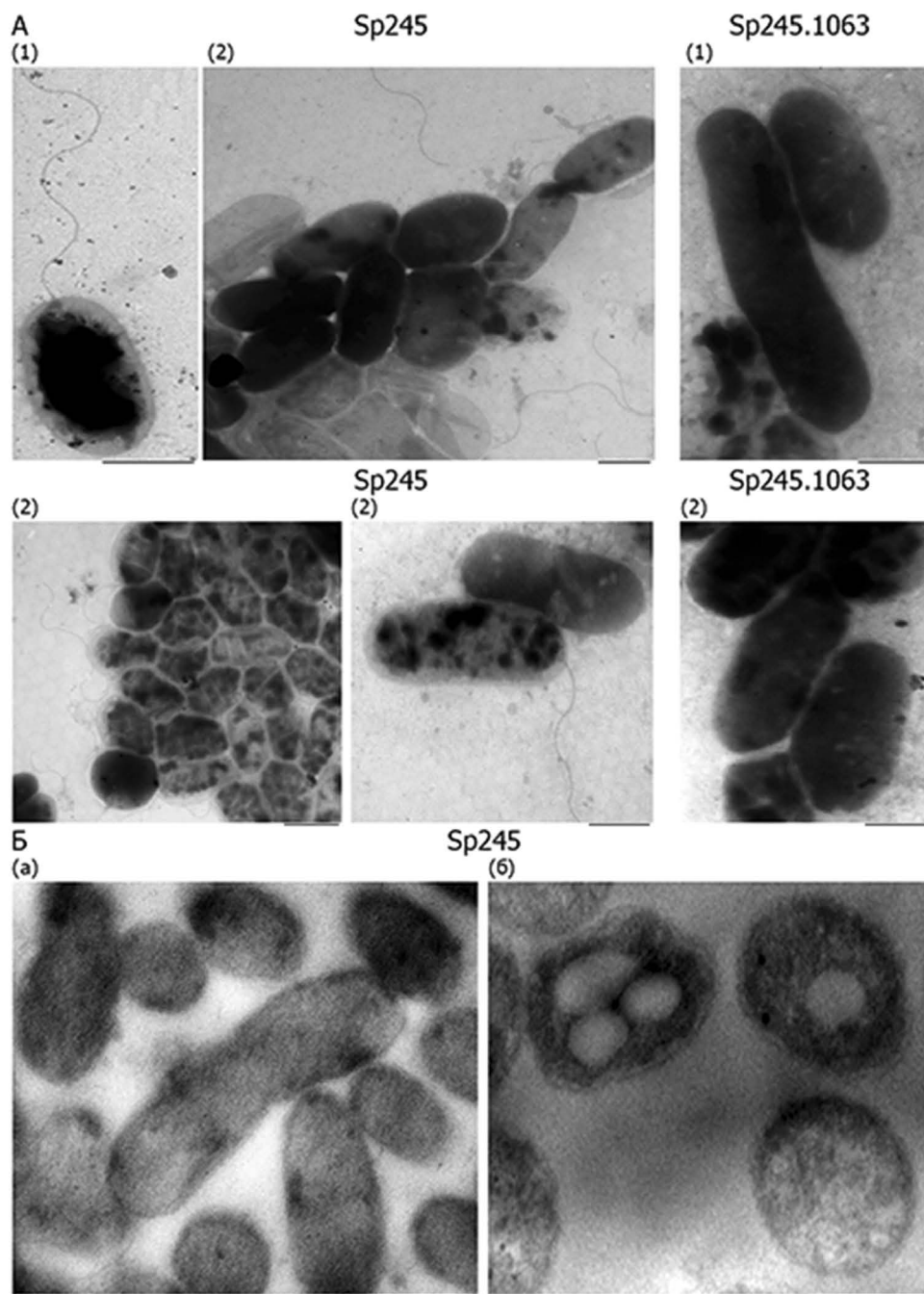


Рис. 1. А — Просвечивающая электронная микроскопия клеток *A. baldaniorum* Sp245 и Sp245.1063 из 20 ч жидких культур (1) или биопленок (2), сформированных на стекле под жидкой средой за 6 сут культивирования. Б — Просвечивающая электронная микроскопия ультратонких срезов клеток *A. baldaniorum* Sp245 из фрагментов биопленок, сформированных под жидкой средой на поверхности стекла за 6 сут культивирования. На панели (а) представлены “вегетативные” и “длинные” клетки, на панели (б) показаны “цистоподобные формы”. Масштабная линейка — 1 мкм.

этих штаммов. Однако при измерении на других частотах, в случае сравнения клеток из биопленочных культур Sp245 и Sp245.1063, не наблюдали тенденций, характерных для планктонных бактерий этих штаммов (рис. 2Б (1 и 2)).

Характеристика микро- и ультраструктуры клеток в зрелых биопленках. С помощью атомно-силовой и электронной микроскопии исследованы клетки из нативных и смытых с поверхности стекла пленок. По сравнению с планктонной культурой доля

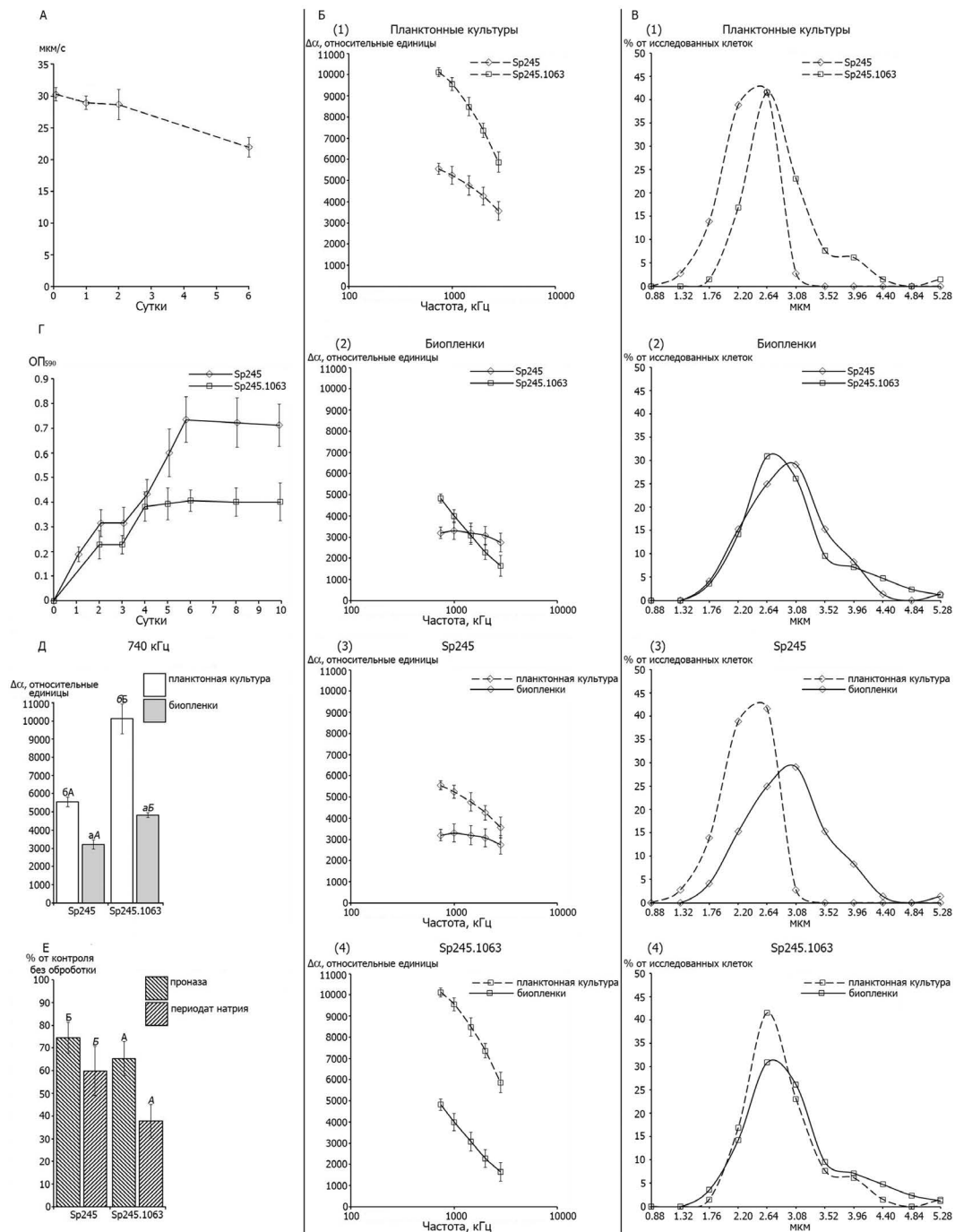


Рис. 2. А — Влияние состава среды на скорость движения планктонных клеток *A. baldaniorum* Sp245 в жидкой среде. Б — Электрофизические профили бактерий из планктонных 20-ч жидких культур и 6-сут биопленок. В — Распределение клеток по длине. Средняя длина клеток *A. baldaniorum* Sp245 и Sp245.1063 соответственно штамму в 20 ч планктонных жидких культурах составляла (2.6 ± 0.3) и (2.1 ± 0.2) мкм, (2.8 ± 0.3) и (2.8 ± 0.2) мкм в случае 6-сут биопленок. Г — Динамика накопления биомассы в биопленках, сформированных *A. baldaniorum* Sp245 и Sp245.1063 на стекле под жидкой LB. ОП₅₉₀ — оптическая плотность кристаллического фиолетового, десорбированного после окрашивания биопленок. Д — Результаты изменения величины электрооптического сигнала клеток на частоте 740 кГц. Е — Влияние проназы и периодата натрия на биомассу 6-сут биопленок, сформированных на стекле под жидкой средой LB. % — процентное отношение оптической плотности красителя, десорбированного с окрашенных пленок после их инкубации в растворе проназы или периодата натрия к аналогичному показателю без обработки. Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) данных на панелях (Д) и (Е) проводили, сравнивая показатели каждого штамма (строчные буквы) или сопоставляя показатели Sp245 и Sp245.1063 (заглавные буквы); разными буквами обозначены статистически значимые различия; а, а, А и А — средние значения с наименьшей величиной.

Таблица. Биомасса (а, д), толщина (г) и количество КОЕ (б, в) в зрелых биопленках *A. baldaniorum*, сформированных в стеклянных пробирках под жидкой LB за 6 сут

Штамм	Условия культивирования				
	Статично				Перемешивание, 140 об./мин
	(а)	(б)	(в)	(г)	(д)
	A_{590} ($l = 0.5$ см) кристаллического фиолетового, десорбированного после окрашивания биопленок	*Количество КОЕ в 1 мл суспензии смытой биомассы нативной биопленки	*Количество КОЕ в 1 мл суспензии смытой биомассы сухой биопленки	Толщина биопленок, мкм	A_{590} ($l = 0.5$ см) кристаллического фиолетового, десорбированного после окрашивания биопленок
Sp245	0.72 ± 0.06 аБ	$(2.6 \pm 0.3) \times 10^7$	$(3.6 \pm 0.7) \times 10^6$	33.7 ± 3.5 Б	0.70 ± 0.09 аБ
Sp245.1063	0.42 ± 0.04 БА	$(1.5 \pm 0.5) \times 10^7$	$(3.0 \pm 0.4) \times 10^3$	23.7 ± 2.5 А	0.22 ± 0.04 аА

Примечание. Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) данных в колонках (а), (г) и (д) проводили, сравнивая показатели каждого штамма (строчные буквы) или сопоставляя показатели Sp245 и Sp245.1063 (заглавные буквы); разными буквами обозначены статистически значимые различия; а, А и А – средние значения с наименьшей величиной. *Биомассу биопленки смывали 2 мл 50 мМ ФБ (рН 7.0).

клеток, лишенных Fla, в зрелых пленках Sp245 возрастает, однако особи, продолжающие синтезировать жгутик, были обнаружены на всех этапах формирования биопленок этим штаммом (рис. 1А и 3). Филаменты Fla в пленках Sp245, переплетаясь, образуют сеть (рис. 3а, 3г). У Sp245.1063 бактерии, синтезирующие Fla, в пленках отсутствуют (рис. 1А). В биопленках, образованных на твердой поверхности штаммом Sp245, как и в случае Fla⁻ Laf⁻ мутанта Sp245.1063, отсутствовали латеральные жгутики (рис. 1А).

Зрелые биопленки азоспирилл содержали различного диаметра везикулы/пузырьки (рис. 1А и 3). При атомно-силовой микроскопии в случае пленок Sp245 на разделе жидкость/воздух везикулы встречались чаще, чем в биопленках на границе жидкость/твердая поверхность (рис. 3б, 3в, 3д, 3е). Расположение пузырьков в биопленках не регулярно, в отличие от клеточных кластеров, состоящих из 3–5 бактерий (рис. 3). Как правило, везикулы формируются из наружной мембраны грамотрицательных бактерий и содержат ферменты и нуклеиновые кислоты. Не исключено, что везикулы/пузырьки также способствуют сохранению стабильного положения биопленок азоспирилл на границе жидкость/воздух.

Планктонные клетки Sp245.1063 были на 20% длиннее Sp245 (средняя длина бактерий составляла соответственно (2.6 ± 0.3) и (2.1 ± 0.2) мкм). Этот показатель морфологии бактерий в биопленках у Sp245.1063 и Sp245 не отличался (средняя длина клеток составляла соответственно (2.8 ± 0.3) и (2.8 ± 0.2) мкм). Распределение клеток в биопленочной популяции Sp245 и Sp245.1063 по размеру были примерно одинаковыми (рис. 2В (2)).

При сравнении клеток Sp245.1063 из планктонной и биопленочной культуры не обнаружили существенной разницы в их длине и в распределении по размеру (рис. 2В (4)). В случае штамма Sp245 бактерии из биопленок были длиннее клеток из планктонной культуры, а их распределение в популяции по размеру различалось (рис. 2В (3)).

Выраженный полиморфизм размера и формы бактерий, сформировавших биопленки, подтверждает анализ их ультратонких срезов. На срезах биопленок, подробно исследованных на примере Sp245, обнаруживались вегетативные клетки (В-клетки), характерные для планктонных культур, которые являются вибрионами с минимальным количеством включений (рис. 1Б). Тонкий слой капсулы тесно связан с липополисахаридом наружной мембраны В-клеток. Встречаются клетки, лишенные выраженной капсулы, делящиеся особи и длинные клетки (Д-клетки), а также клетки яйцевидной формы (рис. 1Б) средних и больших размеров – цистоподобные формы (ЦП-формы. Часть Д-клеток, как и ЦП-формы, покрыты выраженным внешним слоем (рис. 1Б). Наличие в биопленках ЦП-форм способствует выживанию биопленочных популяций азоспирилл в условиях высушивания (Шелудько и соавт., 2020). Биопленки Sp245.1063 содержат на порядок меньше, чем штамм Sp245, устойчивых к высушиванию клеточных форм (таблица).

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты анализа электрофизических профилей планктонных бактерий показали, что в случае мутанта Sp245-*flhB1::Omegon-Km* (Sp245.1063),

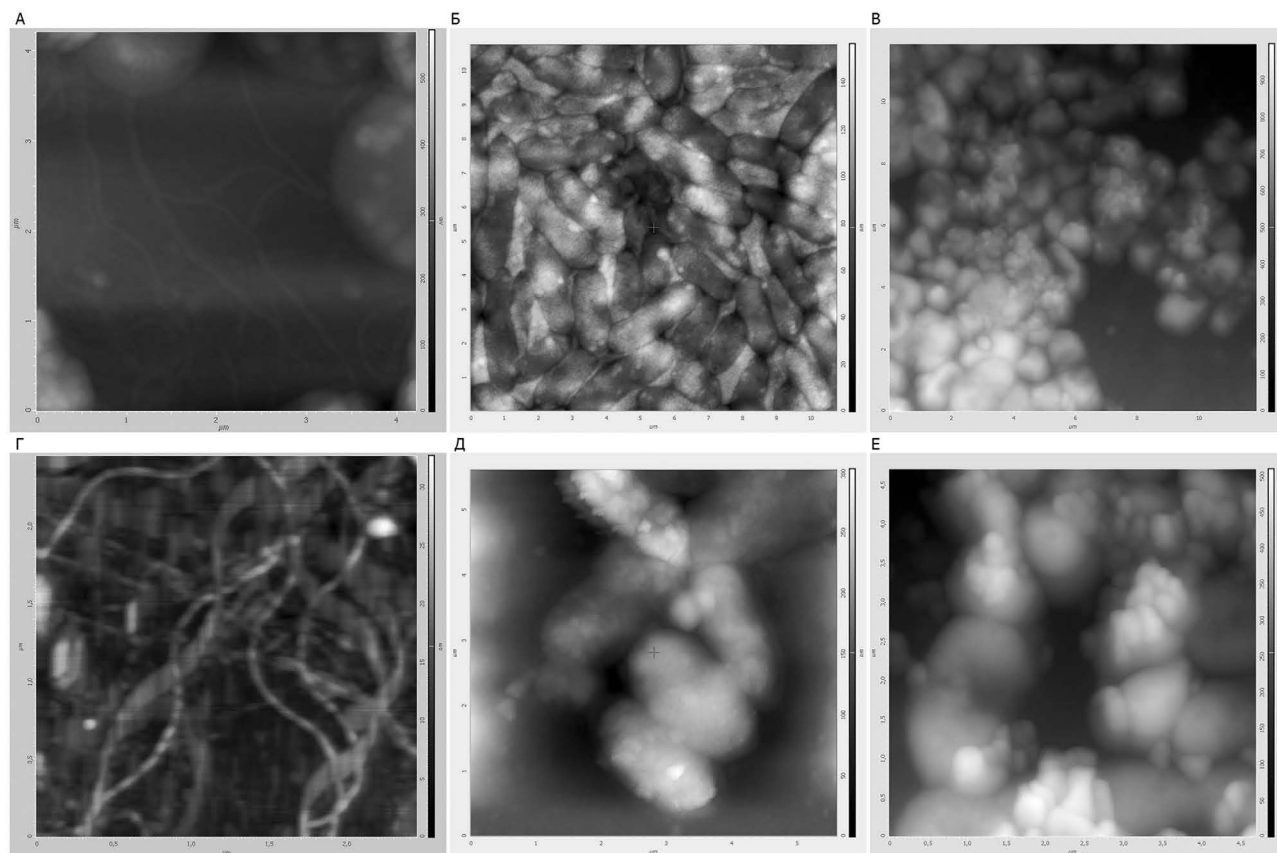


Рис. 3. Результаты атомно-силовой микроскопии. АСМ-изображения 6-сут биопленок штамма *A. baldaniorum* Sp245, сформированных на разделе жидкая LB/стекло (А, Б, Г, Д), жидкая LB/воздух (В, Е).

на клетках которого отсутствовал Fla (Filip'echeva et al., 2018), величина зарегистрированных сенсорных переменных значительно увеличивается по сравнению с показателями у *A. baldaniorum* Sp245. Очевидно, характеристики электрофизических профилей клеток азоспирилл согласуются с изменениями морфологии/микроструктуры бактерий. Данное обстоятельство свидетельствует о перспективности использования данного показателя клеток и для характеристики бактерий из биопленок, поскольку переход свободнодвижущих микробов к прикрепленному существованию сопровождается изменением их морфологии. Действительно, в случае каждого исследованного штамма при сравнении планктонных и биопленочных клеток наблюдали заметные отличия в их электрофизических профилях.

Используя метод, основанный на окрашивании бактериальных пленок неспецифическим красителем кристаллическим фиолетовым (O'Toole, Kolter, 1998), сравнили динамику формирования биопленок на гидрофильной поверхности под жидкой средой в статичных условиях штаммом Sp245 и Fla⁻Laf⁻ мутантом Sp245-*flhB1::Omegon-Km*

(Sp245.1063). Этот метод позволил обнаружить, что относительное количество биомассы зрелых биопленок Sp245.1063 заметно отличалось от показателей, характерных для Sp245. Электрофизические профили бактерий из биопленок Sp245 и мутанта Sp245.1063 также различались. Результаты электронной микроскопии показали, что по сравнению с планктонной культурой доля клеток, лишенных Fla, в пленках Sp245 возрастает, однако доля особей, продолжающих синтезировать жгутик, остается значительной. В биопленках родительского штамма, как и в случае Fla⁻Laf⁻ мутанта, отсутствовали Laf, синтез которых у азоспирилл индуцируется на полужидких и плотных агаризованных средах (Moens et al., 1996; Filip'echeva et al., 2018). Положение электрофизического профиля биопленочных клеток Sp245.1063 относительно Sp245 свидетельствует о том, что у последнего величина зарегистрированных изменений заметно ниже на частоте 740 кГц, как и в случае их планктонных культур. Согласно модели микробной клетки (Bai et al., 2006), изменения, зарегистрированные на частоте 740 кГц, характеризуют изменение свойств клеточной поверхности. На других

частотах, в случае сравнения клеток из биопленочных культур, мы не наблюдали высоких значений сенсорных переменных у Fla^- мутанта (по сравнению с Sp245), характерных для его планктонных бактерий. Это может свидетельствовать о схожих параметрах клеток в биопленках Sp245.1063 и Sp245, влияющих на величину сенсорных переменных, зарегистрированных на частотах выше 740 кГц.

Помимо измерения поляризационных параметров электрооптический метод анализа суспендированных клеток позволяет охарактеризовать размер клеток (Van De Merwe et al., 2004; Junne et al., 2010). После окончания действия электрического поля клетки из частичного ориентированного состояния под воздействием броуновского движения переходят в хаотическое движение. Фракция каждого размера представляет собой экспоненту с показателем, связанным с размером и формой клеток и весовым множителем, равным их парциальной концентрации. В сумме эти экспоненты формируют суммарную релаксационную кривую. Известно, что при периодическом культивировании форма функции распределения размеров бактерий остается постоянной, и релаксационная кривая сохраняет свою форму. Но временной масштаб может меняться. Если взять для сравнения две релаксационные кривые от разных клеток или различных фаз роста одного вида клеток и вытягивать или сжимать одну из кривых по времени, то полное совпадение формы этих кривых будет подтверждать идентичность функций распределения клеток по размерам. Так, при анализе результатов электронной микроскопии мы обнаружили примерно одинаковое распределение клеток в биопленочной популяции Sp245 и Sp245.1063 по размеру. Средняя длина бактерий из биопленок Sp245 и Sp245.1063 также не различалась. Сравнение клеток Sp245.1063 из планктонной и биопленочной культуры показало отсутствие существенной разницы в их длине и в распределении по размеру. В случае штамма Sp245 бактерии из биопленок были длиннее клеток из планктонной, а их распределение в популяции по размеру отличалось. Положение электрофизического профиля планктонных клеток Sp245, по отношению такового у биопленочных бактерий, свидетельствует о снижении величины зарегистрированных изменений у последних. Сходная тенденция характерна и для Fla^- мутанта. Таким образом, при трактовке результатов сенсорного анализа клеток из биопленочной популяции Sp245 и Sp245.1063 длина клеток, их распределение по этому показателю не являются определяющими.

Морфологический и функциональный полиморфизм клеточных форм в биопленках азоспирилл практически не охарактеризован, хотя типичен для вегетативных клеток этих бактерий, выросших в жидких или на плотных средах

(Dobereiner, Day, 1975; Wang et al., 2017; Шелудько и соавт., 2020). В планктонных культурах азоспирилл, в том числе штамма Sp245, среди вегетативных клеток, являющихся вибрионами с минимальным количеством включений, встречаются делящиеся и длинные клетки (Dobereiner, Day, 1975; Шелудько и соавт., 2020). Анализируя ультратонкие срезы биопленок, мы обнаружили вегетативные клетки, характерные для планктонных культур, длинные клетки, а также клетки яйцевидной формы средних и больших размеров — цистоподобные формы (ЦП-формы), которые описаны в старых культурах азоспирилл, в частности, в среде без источника связанного азота. Часть длинных клеток, как и ЦП-формы, покрыта выраженным внешним слоем. Очевидно, полиморфизм клеток, обусловленный их ультраструктурой, в значительной степени определяет показатели, фиксируемые электрооптической сенсорной системой при сравнительном анализе планктонных и биопленочных бактерий.

Мы наблюдали, что биопленки Sp245 и Sp245.1063 отличаются численностью ЦП-форм, способствующих выживанию азоспирилл в условиях высушивания (Шелудько и соавт., 2020). Также у клеток каждого из исследованных нами штаммов соотношение белковых и углеводсодержащих структур, соединяющих бактерии в биопленке и обеспечивающих ее прикрепление к поверхности, было индивидуальным. Эти характеристики биопленочных клеток также могут оказывать влияние на электрофизические профили бактерий из биопленок Sp245 и Sp245.1063 и определять различия между штаммами. Так на клетках азоспирилл, сформировавших биопленки, могут присутствовать полярный жгутик, пили, белки лектиновой природы, амилоидные структуры, глюканы и другие гликополимеры капсулы (Wisniewski-Dyé et al., 2011; Шумилова и соавт., 2016; Shelud'ko et al., 2019).

Таким образом, использование сенсорной системы позволяет сравнить клетки, сформировавшие биопленки, различных штаммов/производных одного штамма и сопоставить их с бактериями из планктонных культур. Традиционно для таких сравнений используют целый набор сложных и трудоемких методических подходов, требующих специальной подготовки образцов (Salcedo et al., 2015). Необходимо отметить, что микро/ультраструктура, жизнеспособность и метаболизм планктонных или сформировавших биопленки бактерий довольно разнообразны и изменчивы (Wang et al., 2017; Шелудько и соавт., 2020). То же самое относится и к заселяемым микробами субстратам. В данной работе мы охарактеризовали динамику формирования биопленок на гидрофильной абиотической поверхности штаммом *A. baldaniorum* Sp245 и его мутантом Sp245-*flhB1::Omegon-Km*, имеющим дефекты в синтезе жгутиков

и подвижности клеток. Используя сенсорную систему, в основе которой лежит определение электрофизических профилей клеток, мы смогли выявить различия не только между планктонными и биопленочными бактериями, но и между клетками родительского штамма и его мутантов. При сравнении клеток родительского штамма и мутанта или планктонных и биопленочных бактерий переменные, фиксируемые электрооптической сенсорной системой, согласуются с зафиксированными другими методами изменениями микро- и ультраструктуры бактерий. Использование оптической сенсорной системы является перспективной основой для оценки эффективности формирования/фиксации биопленок на поверхности корня потенциального растения-хозяина. Известно, что взаимодействие азоспирилл с различными биомакромолекулами, в том числе растительными лектинами, влияющими на подвижность клеток этих бактерий и определяющими специфичность их прикрепления к растительным корням (Yagoda-Shagam et al., 1988; Skvortsov, Ignatov, 1998; Yegorenkova et al., 2001; Shelud'ko et al., 2009), влияет на их электрофизические профили (Гулий и соавт., 2008). Результаты анализа электрофизических профилей бактерий в данной работе могут быть использованы в качестве эталонных, как при характеристике специфичности начальных этапов взаимодействия микроорганизмов (профили планктонных свободноживущих клеток) с корневой системой растений, так и последующих этапов фиксации пленок на растении (профили биопленочных клеток).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, где в качестве объектов использовались люди или животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гулий О.И., Антонюк Л.П., Игнатов В.В., Игнатов О.В. Динамика изменений электрофизических свойств клеток *Azospirillum brasilense* Sp7 при их связывании с агглютинином зародыша пшеницы // Микробиология. 2008. Т. 77. С. 782–787.
- Guliy O.I., Antonyuk L.P., Ignatov V.V., Ignatov O.V. Dynamics of the changes of electrophysical properties of *Azospirillum brasilense* Sp7 cells at their binding with wheat germ agglutinin // Microbiology (Moscow). 2008. V. 77. P. 695–699.
- Шелудько А.В., Широков А.А., Соколова М.К., Соколов О.И., Петрова Л.П., Матора Л.Ю., Кацы Е.И. Колонизация корней пшеницы бактериями *Azospirillum brasilense* с различной подвижностью // Микробиология. 2010. Т. 79. С. 696–704.
- Shelud'ko A.V., Shirokov A.A., Sokolova M.K., Sokolov O.I., Petrova L.P., Matora L.Yu., Katsy E.I. Wheat root colonization by *Azospirillum brasilense* strains with different motility // Microbiology (Moscow). 2010. V. 79. P. 688–695.
- Шелудько А.В., Филипьева Ю.А., Шумилова Е.М., Хлебцов Б.Н., Буров А.М., Петрова Л.П., Кацы Е.И. Изменения в формировании биопленок у *flhB1* мутанта бактерии *Azospirillum brasilense* Sp245, лишённого жгутиков // Микробиология. 2015. Т. 84. С. 175–183.
- Shelud'ko A.V., Filip'echeva Y.A., Shumilova E.M., Khlebtsov B.N., Burov A.M., Petrova L.P., Katsy E.I. Changes in biofilm formation in the nonflagellated *flhB1* mutant of *Azospirillum brasilense* Sp245 // Microbiology (Moscow). 2015. V. 84. P. 144–151.
- Шелудько А.В., Мокеев Д.И., Евстигнеева С.С., Филипьева Ю.А., Буров А.М., Петрова Л.П., Пономарева Е.Г., Кацы Е.И. Анализ ультраструктуры клеток в составе биопленок бактерий *Azospirillum brasilense* // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 59–73.
- Shelud'ko A.V., Mokeev D.I., Evstigneeva S.S., Filip'echeva Yu.A., Burov A.M., Petrova L.P., Ponomareva E.G., Katsy E.I. Cell ultrastructure in biofilms of *Azospirillum brasilense* // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 50–63.
- Шумилова Е.М., Шелудько А.В., Филипьева Ю.А., Евстигнеева С.С., Пономарева Е.Г., Петрова Л.П., Кацы Е.И. Изменение свойств клеточной поверхности и эффективности формирования биопленок у мутантов бактерии *Azospirillum brasilense* Sp245 по предполагаемым генам липидного метаболизма *mmsB1* и *fabG1* // Микробиология. 2016. Т. 85. С. 162–170.
- Shumilova E.M., Shelud'ko A.V., Filip'echeva Y.A., Evstigneeva S.S., Ponomareva E.G., Petrova L.P., Katsy E.I. Changes in cell surface properties and biofilm formation efficiency in *Azospirillum brasilense* Sp245 mutants in the putative genes of lipid metabolism *mmsB1* and *fabG1* // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 172–179.
- Baldani V.L.D., Baldani J.I., Döbereiner J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat // Can. J. Microbiol. 1983. V. 29. P. 924–929.
- Bai W., Zhao K.S., Asami K. Dielectric properties of *E. coli* cell as simulated by the three-shell spheroidal model // Biophys. Chem. 2006. V. 122. P. 136–142.
- Bogino P.C., Oliva M.M., Sorroche F.G., Giordano W. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations // Int. J. Mol. Sci. 2013. V. 14. P. 15838–15859.

- Cámara M., Green W., MacPhee C.E., Rakowska P.D., Raval R., Richardson M.C., Slater-Jefferies J., Steven-ton K., Webb J.S. Economic significance of biofilms: a multidisciplinary and cross-sectoral challenge // *Biofilms Microbiomes*. 2022. V. 8. Art. 42.
- Dos Santos Ferreira N., Sant'Anna F.H., Reis V.M., Ambrosini A., Gazolla Volpiano C., Rothballer M., Schwab S., Baura V.A., Balsanelli E., Pedrosa F.O., Pereira Pas-saglia L.M., Maltempi de Souza E., Hartmann A., Cassan F., Zilli J.E. Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Sp245 as the type strain of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020. V. 70. P. 6203–6212.
- Döbereiner J., Day J.M. Associative symbiosis in tropical grass: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites // *Symposium on Nitrogen Fixation* / Eds. Newton W.E., Nijmans C.J. Pullman: Washington State University Press, 1976. P. 518–538.
- Filip'echeva Y., Shelud'ko A., Prilipov A., Telesheva E., Mo-keev D., Burov A., Petrova L., Katsy E. Chromosomal *flhB1* gene of the alphaproteobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 is essential for correct assembly of both constitutive polar flagellum and inducible lateral flagel-la // *Folia Microbiol.* 2018. V. 63. P. 147–153.
- Guliy O.I., Evstigneeva S.S., Bunin V.D. Electrical sensor system for *in vitro* bacteria biofilm diagnostics // *Bio-sens. Bioelectron.* X. 2022. V. 11. Art. 100174.
- Guttenplan S.B., Kearns D.B. Regulation of flagellar motil-ity during biofilm formation // *FEMS Microbiol. Rev.* 2013. V. 37. P. 849–871.
- Hartmann R., Jeckel H., Jelli E., Singh P.K., Vaidya S., Bayer M., Rode D.K.H., Vidakovic L., Díaz-Pascual F., Fong J.C.N., Dragoš A., Lamprecht O., Thöming J.G., Netter N., Haussler S., Nadell C.D., Sourjik V., Kovács A.T., Yildiz F.H., Drescher K. Quantitative image analysis of microbial communities with Bio-filmQ // *Nat. Microbiol.* 2021. V. 6. P. 151–156.
- Hemdan B.A., El-Taweel G.E., Goswami P., Pant D., Sev-da S. The role of biofilm in the development and dis-semination of ubiquitous pathogens in drinking water distribution systems: an overview of surveillance, out-breaks, and prevention // *World J. Microbiol. Bio-technol.* 2021. V. 37. Art. 36.
- Junne S., Cruz-Bournazou M.N., Angersbach A., Götz P. Electrooptical monitoring of cell polarizability and cell size in aerobic *Escherichia coli* batch cultivations // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2010. V. 37. P. 935–942.
- Moens S., Schlöter M., Vanderleyden J. Expression of the structural gene, *lafI*, encoding the flagellin of the lat-eral flagella in *Azospirillum brasilense* Sp7 // *J. Bacte-riol.* 1996. V. 178. P. 5017–5019.
- O'Toole G.A., Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis // *Mol. Microbiol.* 1998. V. 28. P. 449–461.
- Otto M. Staphylococcal biofilms // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2008. V. 322. P. 207–228.
- Salcedo F., Pereyra C.M., Arruebarrena Di Palma A., Lamattina L., Creus C.M. Methods for studying bio-films in *Azospirillum* and other PGPRs // *Handbook for Azospirillum* / Eds. Cassán F., Okon Y., Creus C. Springer, Cham., 2015. P. 199–229.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- Schelud'ko A.V., Makrushin K.V., Tugarova A.V., Kresti-nenko V.A., Panasenkov V.I., Antonyuk L.P., Katsy E.I. Changes in motility of the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* in the presence of plant lectins // *Microbiol. Res.* 2009. V. 164. P. 149–156.
- Shelud'ko A.V., Filip'echeva Y.A., Telesheva E.M., Yevstign-eeva S.S., Petrova L.P., Katsy E.I. Polar flagellum of the alphaproteobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 plays a role in biofilm biomass accumulation and in biofilm maintenance under stationary and dy-namic conditions // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2019. V. 35. Art. 19.
- Skvortsov I.M., Ignatov V.V. Extracellular polysaccharides and polysaccharide-containing biopolymers from *Azospirillum* species: properties and the possible role in interaction with plant roots // *FEMS Microbiol. Lett.* 1998 V. 165. P. 223–229.
- Van De Merwe W.P., Czégé J., Milham M.E., Bronk B.V. Rapid optically based measurements of diameter and length for spherical or rod-shaped bacteria *in vivo* // *Appl. Opt.* 2004. V. 43. P. 5295–5302.
- Wang D., Xu A., Elmerich C., Ma L.Z. Biofilm formation enables free-living nitrogen-fixing rhizobacteria to fix nitrogen under aerobic conditions // *ISME J.* 2017. V. 11. P. 1602–1613.
- Wisniewski-Dyé F., Borziak K., Khalsa-Moyers G., Alex-andre G., Sukharnikov L.O., Wuichet K., Hurst G.B., McDonald W.H., Robertson J.S., Barbe V., Calteau A., Rouy Z., Mangenot S., Prigent-Combaret C., Normand P., Boyer M., Siguier P., Dessaux Y., Elmerich C., Con-demine G., Krishnen G., Kennedy I., Paterson A.H., Gonzalez V., Mavingui P., Zhulin I.B. *Azospirillum* ge-nomes reveal transition of bacteria from aquatic to ter-restrial environments // *PLoS Genet.* 2011. V. 7. Art. e1002430.
- Yagoda-Shagam J., Barton L.L., Reed W.P., Chiovetti R. Fluorescein isothiocyanate-labeled lectin analysis of the surface of the nitrogen-fixing bacterium *Azos-pirillum brasilense* by flow cytometry // *Appl. Environ. Microbiol.* 1988. V. 54. P. 1831–1837.
- Yegorenkova I.V., Konnova S.A., Sachuk V.N., Ignatov V.V. *Azospirillum brasilense* colonisation of wheat roots and the role of lectin–carbohydrate interactions in bacteri-al adsorption and root-hair deformation // *Plant Soil.* 2001. V. 231. P. 275–282.

EXPERIMENTAL ARTICLES

Analysis of Electrophysical Profiles of Plankton and Biofilm Cells on the Model of *Azospirillum baldaniorum* Bacteria

A. V. Sheludko^{1, *}, S. S. Evstigneeva¹, E. M. Telesheva¹, Yu. A. Filip'echeva¹,
L. P. Petrova¹, D. I. Mokeev¹, I. V. Volokhina¹, I. V. Borisov¹, V.D. Bunin², O. I. Guliy^{1, **}

¹*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Federal Research Center
"Saratov Scientific Center of the Russian Academy of Sciences", Saratov, 410049, Russia*

²*EloSystem GbR, Berlin 13407, Germany*

^{*}, ^{**}*e-mail: shel71@yandex.ru; guliy_olga@mail.ru*

Biofilm formation is a widespread phenomenon in the world of microbes. They can affect human and animal health, cause damage to various industries, and at the same time can be useful in areas such as wastewater treatment or increasing the bioavailability of nutrients for plants. This actualizes the development of biofilm research methods. In this paper, an optical sensor method for indicating bacterial biofilm formation taking into account biological variability is described for the first time using the example of plant growth-stimulating rhizobacteria of the genus *Azospirillum*. A correlation was found between changes in the electrophysical parameters recorded by the sensor system and morphological features of bacteria from planktonic and/or biofilm cultures: the presence of motor organelles (flagella), polymorphism and ultrastructure of cellular forms. It was found that the profile of microbial cells recorded by the optical system in planktonic and biofilm forms differs significantly. When comparing cells of different strains (parent strain and its derivatives) or planktonic and biofilm bacteria, the variables recorded by the electro-optical sensor system are consistent with the changes in the micro- and ultrastructure of bacteria recorded by us using other methods. The results of the analysis of the electrophysical profiles of *A. baldaniorum* Sp245 can be used as a reference for identifying the specificity of the interaction of biofilm cells of this strain with various components of the root surface of the putative plant partner using an optical sensor system.

Keywords: *Azospirillum baldaniorum*, biosensors, flagella, motility, biofilms, ultrastructure